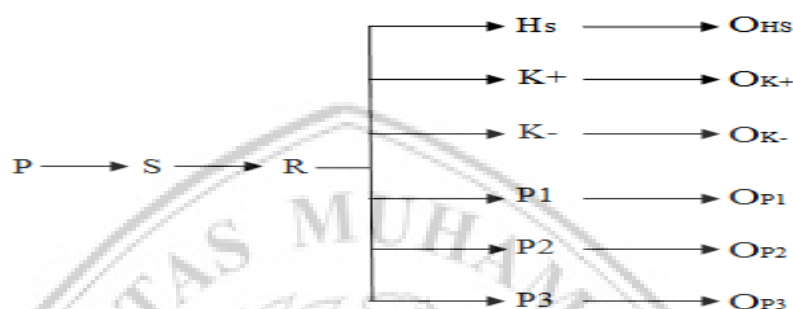


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian *true experimental* dengan menggunakan metode *the post test only control group design* dimana sampel di pilih secara acak dan dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu terdiri dari 3 kelompok kontrol, yaitu kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), kontrol hewan sehat (HS), dan 3 kelompok uji yaitu P1, P2, dan P3.



**Gambar 4. 1** Rancangan Metode *The Post Test Only Control Grup Design*

Keterangan :

P : Populasi

S : Sampel

R : Randomisasi

Hs : Hewan sehat diberi pakan standart selama penelitian

K<sub>+</sub> : Perlakuan kelompok kontrol positif diberi pakan standart + terapi simvastatin 0,18 mg/200 g BB tikus + terapi glibenklamid 0,09 mg/200g

K<sub>-</sub> : Perlakuan kelompok kontrol negatif diberi pakan standart + aquadest

P<sub>1</sub> : Perlakuan kelompok uji diberi Kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 125 mg/kg BB dan perasan buah okra 0,36 mL/200g BB

P<sub>2</sub> : Perlakuan kelompok uji diberi kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 250 mg/kgBB dan perasan buah okra 0,36 mL/200gBB

P<sub>3</sub> : Perlakuan kelompok uji diberi kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 500 mg/kgBB dan perasan buah okra 0,36mL/200gBB

O<sub>s</sub> : Kadar Kolesterol Total pada kelompok hewan sehat

O<sub>K+</sub> : Kadar Kolesterol Total pada kelompok kontrol positif

$O_{k-}$  : Kadar Kolesterol Total pada kelompok kontrol negative

$O_{p1}$  : Kadar Kolesterol Total pada kelompok perlakuan 1

$O_{p2}$  : Kadar Kolesterol Total pada kelompok perlakuan 2

$O_{p3}$  : Kadar Kolesterol Total pada kelompok perlakuan 3

## 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan daun mangga arumanis dilakukan di Kediri. Sedangkan penelitian dilakukan di Laboratorium Sintesa Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang. Kemudian dilanjutkan tahap pembedahan dan pengambilan sampel darah dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Malang. Selanjutnya untuk pengukuran kadar Kolesterol Total dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu pelaksanaan kegiatan pada bulan Februari-April 2018.

## 4.3 Populasi dan Sampel

### 4.3.1 Populasi

Populasi sampel dalam penelitian ini adalah menggunakan tikus putih jantan galur wistar *Rattus norvegicus* dengan berat badan 150-200 g usia 2-3 bulan sebagai hewan coba. Tikus yang digunakan adalah tikus sehat yang ditandai dengan perilaku normal dan memiliki nafsu makan yang baik serta diadaptasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan di laboratorium sebagai hewan coba.

### 4.3.2 Sampel dan Besar Sampel

Jumlah sampel (hewan coba) yang diperlukan pada penelitian ini menggunakan rumus (Pusdatin, Kemkes RI) :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5)(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

**Keterangan :**

t = banyak kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi (besar sampel)

Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar sampel yang diperlukan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah minimal 4 ekor tikus. Pada

penelitian ini, jumlah tikus yang digunakan untuk 6 kelompok perlakuan yaitu masing-masing sebanyak 4 ekor tikus. Tikus sebanyak 4 ekor pada masing-masing kelompok di tempatkan pada kandang berukuran  $\pm 17,5 \times 23,75 \times 17,5$  cm dalam kondisi terawat dan bebas dari polutan dan kebisingan. Suhu yang diatur pada  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  dan relatif kelembaban udara 50-60% dengan 12\12 jam. Siklus terang gelap (ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam). Makanan dan minuman tikus yang disediakan *ad-libitum*. Berat tikus diukur setiap minggu untuk semua percobaan (Badkook, 2013).

#### 4.3.2.1 Kriteria Inklusi

Tikus : Wistar galur murni  
 Tikus : Sehat dan aktif  
 Umur tikus : 2-3 bulan  
 Berat tikus : 150 mg-200 mg  
 Jenis kelamin : Jantan

#### 4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Dianggap masuk dalam kriteria eksklusi apabila tikus jantan mengalami sakit selama adaptasi, kelainan anatomi dan mati.

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang dapat diamati pada penelitian ini yaitu :

##### 1. Variabel bebas :

P1 : Kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* L. var arumanis 125mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.

P2 : Kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* L. var arumanis 250 mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.

P3 : Kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* L. var arumanis 500 mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.

##### 2. Variabel tergantung :

Kadar Kolesterol Total.

##### 3. Variabel kontrol :

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes.

#### 4. Variabel penganggu :

##### a. Dapat dikendalikan

Jenis kelamin, umur, faktor hormonal, makanan, minuman, kondisi (*stress*).

##### b. Tidak dapat dikendalikan

Penyakit hati, penyakit pankreas.

### 4.5 Alat dan Bahan

#### 4.5.1 Alat

- Timbangan untuk menimbang berat badan tikus
- Timbangan untuk menimbang Ekstrak Etanol Daun Mangga Arumanis
- Kandang tikus beserta perlengkapan untuk pemberian makan untuk tikus
- Botol air
- Gelas ukur
- Erlenmeyer
- Beaker glass
- Batang pengaduk
- Corong gelas
- Cawan porselin
- Kertas saring
- Alumunium foil
- Sonde
- Spuit
- Kapas
- Alkohol swab
- Spektrofotometer
- Mortir stemper
- Jarum hematokrit

#### 4.5.2 Bahan

- Daun Mangga Arumanis (*Mangifera indica* L. var Arumanis)
- Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench)
- Aloksan monohidrat
- NaCl 0,9 %
- Gula jagung
- Pakan BR 1
- Glibenklamid 5 mg
- Simvastatin
- Kloroform

### 4.5.3 Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih jantan *Rattus novergicus*.

## 4.6 Pengumpulan Data

### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Pada penelitian ini sampel atau hewan coba yang di gunakan adalah tikus putih jantan galur *wistar* dengan bobot 150-200 g berusia 2-3 bulan. Sampel di ambil secara acak dan termasuk jenis *random sampling (probability sampling)* dimana tiap unit atau individu dalam suatu populasi memiliki probabilitas yang sama untuk di jadikan sampel. Berdasarkan protokol yang disahkan oleh *The Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animal (CPCSEA)*, hewan coba di pelihara pada kondisi lingkungan yang standar (22-28°C, ada pertukaran gelap terang setiap 12 jam) dan di beri makan dengan pakan standar dan air *ad libitum*. Hewan coba di adaptasi dengan menempatkannya pada kandang selama 7 hari terlebih dahulu sebelum penelitian. Setelah masa adaptasi hewan coba dipindahkan untuk masing-masing kelompok percobaan dan diberi tanda pada bagian ekor menggunakan spidol untuk membedakan antara tikus satu dengan lainnya, kemudian dilakukan induksi diabetes. Dilakukan penimbangan berat badan tikus diakhir minggu pada semua kelompok perlakuan untuk melihat adanya pengaruh perbedaan perlakuan.

### 4.6.2 Induksi Aloksan

Hewan uji sebelum diinduksi aloksan, dipuaskan terlebih dahulu selama 18 jam namun tetap diberikan air minum (Etuk, 2010). Hal ini dikarenakan hewan uji yang dipuaskan lebih rentan mengalami hiperglikemia dibanding hewan uji yang tidak dipuaskan. Setelah itu larutan aloksan monohidrat disuntikkan secara intraperitoneal dengan dosis 150mg/Kg BB (Zhang *et al*, 2006 ; Etuk, 2010) tikus pada kelompok II (kontrol positif), kelompok III (kontrol perlakuan), kelompok IV (kontrol negatif) yang masing-masing terdiri dari 4 hewan uji.

Tikus diabetes setelah penyuntikkan diberi makan dan minum seperti biasa. Tikus diabetes dinilai dengan mengukur kadar glukosa plasma non-puasa setelah 72 jam dari injeksi aloksan. Pemberian aloksan dilakukan sebanyak satu kali (Etuk, 2010).

#### 4.6.3 Prosedur Ekstraksi Daun *Mangifera indica* L. var *arumanis*

Simplisia dari daun *Mangifera indica* L. var *arumanis* yang telah berbentuk serbuk direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3 L selama 4 jam. Tahap ekstraksi ini dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% perbandingan 1 : 10. Hasil rendaman kemudian dilakukan pengadukan selama 4 jam dan hasilnya akan disaring dengan menggunakan corong buchner. Setelah didapatkan filtrat, residu hasil penyaringan kemudian direndam kembali dengan etanol 96% untuk diambil kembali filtratnya dengan perbandingan kedua (1 : 5). Proses ini diulang 3 kali kemudian dimasukkan ke dalam rotavapor untuk mendapatkan ekstrak daun *Mangifera indica* L. var *arumanis* yang kental. Selanjutnya ekstrak yang didapat dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40 ° C (Liga, 2008).

#### 4.6.4 Prosedur Perasan Buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Pembuatan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench menurut penelitian (Hargono et al, 2010; Kusuma et al, 2011) yaitu dengan mencampur 30 gram buah okra segar dengan 20 mL air yang akan menghasilkan 40 mL filtrat yang kemudian disaring dengan penyaring kain.

#### 4.6.5 Penentuan Konsentrasi Perasan Buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Secara empiris konsumsi okra pada manusia yang dikonsumsi setiap harinya adalah sebesar 20 g setiap harinya.  $20 \text{ g} \times 0,018 = 0,36 \text{ gram}$ . 30 gram menghasilkan 40 ml filtrat, maka 0,36 gram akan dikonversikan dalam 200 gram dalam 200 ml pada penelitian ini sehingga dihasilkan dosis 0,36ml/200g BB (Fauziana, 2016).

#### 4.6.6 Pemberian Bahan Uji

Tikus yang sudah mengalami kondisi diabetes dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus :

1. Tikus diadaptasi selama 7 hari dengan diberi pakan standar selama 7 hari (minggu pertama).
2. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kontrol hewan sehat, di beri pakan standar selama penelitian.
3. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kontrol negatif (K-), yaitu tikus diabetes mellitus diberi diberi pakan standar + aquadest

4. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kontrol positif (K+), yaitu tikus diabetes Mellitus diberi pakan standar + terapi simvastatin 0,18 mg/200 g BB + terapi glibenklamid 0,09 mg/200g BB selama 28 hari.
5. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kelompok perlakuan dosis 1 (P1), yaitu tikus diabetes mellitus diberi kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 125mg/kg BB dan perasan buah okra 0,36mL/200g BB selama 28 hari.
6. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kelompok perlakuan dosis 2 (P2), yaitu tikus diabetes mellitus diberi kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 250mg/kg BB dan perasan buah okra 0,36mL/200g BB selama 28 hari.
7. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kelompok perlakuan dosis 3 (P3), yaitu tikus diabetes mellitus diberi kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 500mg/kg BB dan perasan buah okra 0,36mL/200g BB selama 28 hari.

#### **4.6.7 Pengukuran Kadar Kolesterol Total**

##### **4.6.4.1 Pengambilan Darah Hari ke 3 (72 jam) setelah Induksi Alokan**

Tikus dibersihkan bagian ekor sebelum pengambilan darah dengan alkohol 70%. Darah diambil melalui ujung ekor, dimana ujung ekor tikus ditoreh dengan menggunakan pisau bedah kecil hingga membentuk sayatan yang dalam dan diukur kadar gula darah dengan alat glukometer *Easy Touch GCU* dengan teknologi *electrode-based biosensor*. Caranya dengan setetes darah tikus yang berasal dari ujung ekor ditetaskan pada strip glukosa yang telah dimasukkan dalam glukometer. Selama 10 detik ditunggu untuk menunggu hasil pembacaan konsentrasi glukosa darah pada glukometer. Nilai yang tertera pada glukometer merupakan nilai konsentrasi glukosa darah dengan satuan mg/dL.

##### **4.6.4.2 Pengambilan Darah Hari ke 31 setelah Pemberian Bahan Uji**

Pada akhir masa percobaan tikus dipuasakan selama 12 jam sebelum pengambilan darah, tikus dianestesi terlebih dahulu menggunakan kloroform secara inhalasi pada anesthesia chamber (Fahrimal, 2014). Pengambilan darah menggunakan jarum ukuran 22 G dengan *syringe* 5 mL. Pengambilan darah tikus dilakukan dengan *thoracotomy*, kemudian melalui ventrikel secara perlahan darah diambil (3 mL) untuk menghindari terjadi kolaps jantung (Fahrimal, 2014). Darah

ditampung pada BD vacutainer, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-20 menit (Turchiano, 2013).

Didapatkan serum darah untuk diperiksa kadar kolesterol. Pengukuran kadar kolesterol dilakukan dengan cara mencampur sampel sebanyak 10  $\mu$ L dengan reagen standar GPO-PAP (Biolabo) sebanyak 1000  $\mu$ L, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37° kemudian dibaca absorbansinya pada spektrofotometer (Rini, 2012).

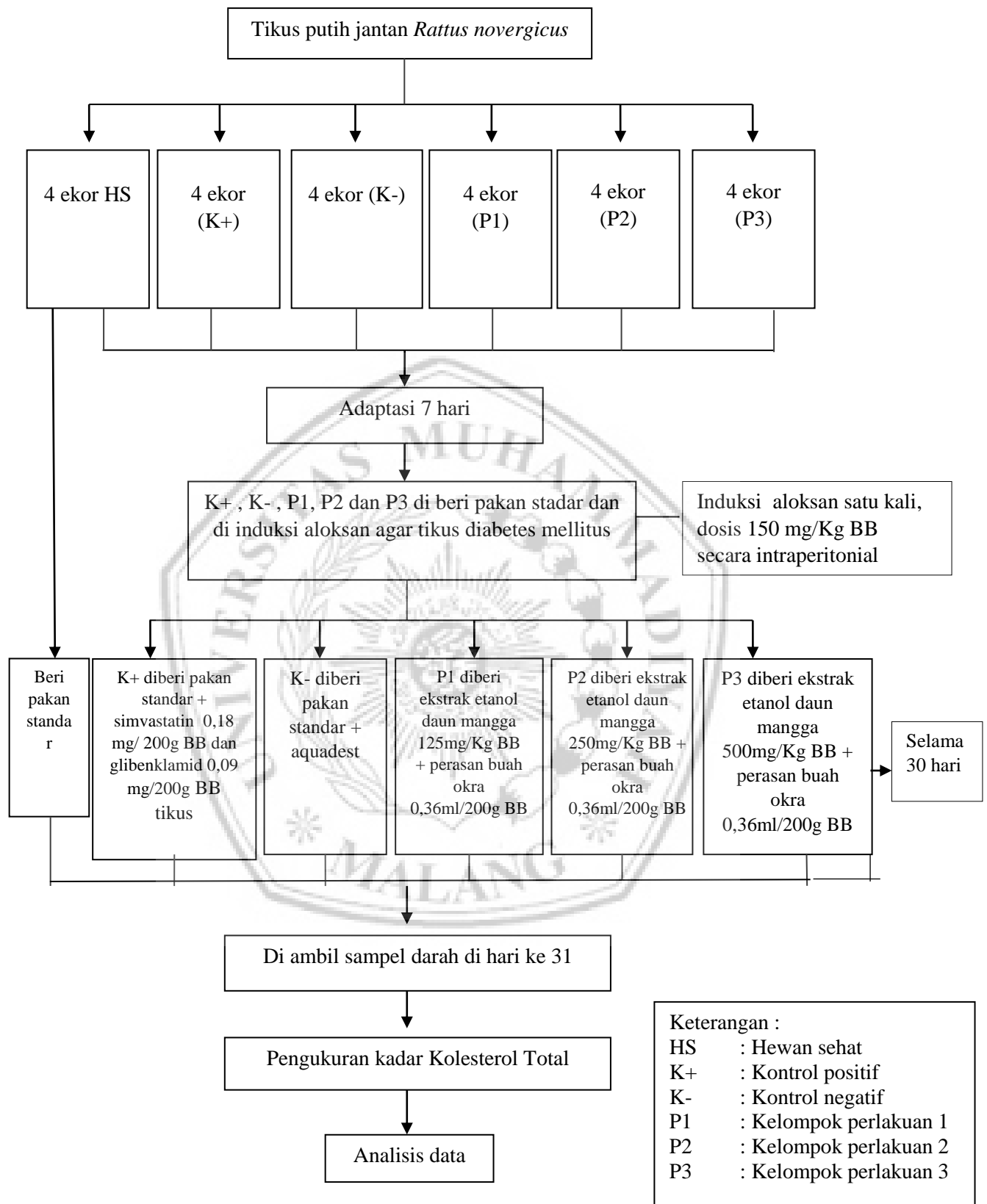
#### **4.7 Analisis Data**

Analisis data dalam penelitian ini yaitu dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* Uji homogenitas dan uji *Post Hoc* LSD dikelola menggunakan *software* SPSS (*Statistic Program for Social Science*) 16 for windows.

1. Analisis *varian* dimana terdapat *variabel* numerik lebih dari dua kelompok, dalam penelitian ini data yang dianalisis yaitu tiga macam dosis kombinasi ekstrak etanol daun mangga dan perasan buah okra pada *Rattus novergicus* diabetes (P1, P2, dan P3). Sebelum pengolahan data harus di pastikan bahwa data yang di peroleh harus homogen sehingga dapat digunakan dalam statistik parametrik (statistik *inferensial*). Data yang bersifat homogen memiliki signifikasi  $p > 0,05$ .
2. Uji ANOVA dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh kombinasi ekstrak etanol daun mangga dan perasan buah okra terhadap penurunan kadar kolesterol total. Hasil uji ANOVA dikatakan ada pengaruh yang sangat bermakna jika nilai signifikan  $p < 0,05$ . Uji *Post Hoc* LSD dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar kelompok uji.



#### 4.8 Alur Penelitian



**Gambar 4. 3** Bagan Alur Penelitian